

# 보툴리눔 독소의 기전

## Basic mechanisms of botulinum toxin



정 선 주

울산의대 서울아산병원 신경과

Botulinum neurotoxin (BoNT) is a toxic substance that is produced by the anaerobic bacterium *Clostridium botulinum*. BoNT has been proven to be the effective and powerful reagents for medical treatment, with more than 50 therapeutic indications. BoNT produces a chemical denervation that is topical, reversible, and dose-dependent. They inhibit the docking and subsequent opening of synaptic vesicles containing acetylcholine in the presynaptic musculoskeletal terminal, resulting in impending neuromuscular transmission. There are seven antigenically distinct BoNT serotypes, named from A to G. The H-chain of the toxin is responsible for the highly selective targeting to cholinergic nerve terminals and the L-chain is the toxic portion of the BoNT. There are four stages involved in modes of BoNT action, including binding, uptake, translocation, and toxin activity. Understanding of these basic mechanisms of BoNT provide potential clinical implications.

## 서 론

보툴리눔 신경독소(botulinum neurotoxin, BoNT)의 분자 구조에 대한 이해와 이를 바탕으로 한 치료적 이용은 지난 30년 동안 많은 발전이 있었다. BoNT의 강력한 작용 기전은 특이적으로 신경말단부에서 세포외유출(exocytosis)에 의해 신경전달 물질을 분비하는 현상을 억제한다. 또한, BoNT에 대한 독소동태학적(toxokinetic) 특징들이 알려지면서 많은 연구자들로 하여금 소포(vesicle), 축삭운반(axonal transport), 신경전달물질의 저장, 수용체의 구획화(compartmentalization) 등의 연구에 발전을 가져왔다. 이런 성과는 세포, 분자 생물학, 약리학, 생리학 등에 새로운 과학기술이 도입되면서 가능하게 되었다.

BoNT가 인류에게 처음 소개될 때는 강력한 독소 또는 무서운 생물학적 무기로 인식되어 이에 대한 치료적 기능을 연구하고 이용하는데 약간의 거부감이 있었지만, 최근에는 앞서 설명한 연구 발전에 기초해서 많은 질환에서 아주 효과적인 치료제로 사용되고 있다. 우리나라는 신경과 질환 치료목적보다는 미용과 성형의 목적으로 더 많이 사용되었고, 고가의 비용으로 인해 신경과 질환의 치료를 위한 사용은 생각보다 적었다. 하지만, 최근 초기에 개발된 BoNT 약물과 동등한 성능의 BoNT제형이 출시되면서 약제비용이 감소하게 되었고, 실제 임상에서 많이 치료제로 사용되는 추세이다.

본문에서는 BoNT의 일반적 특징과 약물학적 특성을 설명했고, 이런 지식을 바탕으로 질환에의 치료적 이용과 앞으로의 발전방향을 설명했다.

## 본 론

### 1. BoNT의 기원

BoNT는 인간이 음식을 장기간 저장하고 이 보관된 음식을 섭취한 행위와 역사를 같이 한다. 하지만, BoNT에 의한 식중독에 기록은 아주 드물고, 18세기에 이르러 나폴레옹 전쟁이 발생하면서 독일의 빈곤층이 생겨나고 시골음식들의 비위생적인 관리 때문에 독일 남서부에 위치한 Württemberg에서 치명적인 식중독이 많은 환자에서 발생하면서 보툴리즘(botulism)에 대한 관심이 증대되었다. 그 후, 1815년에 독일의 공중보건요원인 Steinbuch가 처음으로 간소시지를 먹은 후 식중독에 걸린 7명의 환자를 처음으로 보고하면서 ‘소시지중독(sausage poisoning)’의 원인으로 BoNT가 알려졌다.<sup>1</sup> 그 뒤에도 소시지중독과 비슷한 식중독이 많이 보고되었고, 이에 대한 체계적인 연구가 진행되었다. 역시 독일의 Kerner는 이에 대한 연구를 하던 중, 1822년에 식중독을 일으키는 독소를 치료에 이용할 수 있다는 가능성을 처음으로 제시했다.<sup>2</sup> 1895년 12월에는 독일의 한 작은 마을의 장례식장에서 연주했던 악단 연주자들이 훈제 햄을 먹은 후 집단으로 보툴리즘에 걸렸고,<sup>3</sup> 겐트대학의 미생물학자인 Ermengem이 햄과 희생자들의 비장을 조직검사해서 혐기성세균을 발견하였고 이를 ‘*Bacillus botulinus*’라고 보고했다.<sup>4</sup>

### 2. BoNT의 구조와 효소 작용

BoNT는 *Clostridium botulinum*이라는 간상형(rod-shaped)의 포자형성(spore-forming) 세균이 만들어 내는 독소이다. BoNT는 크기가 매우 크며 복잡한 단백질이다. BoNT는 항원적으로 분명하게 특징지어지는 7가지(BoNT A-G) 종류의 신경독소가 있다.<sup>5</sup> BoNT A-G의 7가지 형태의 독소들은 서로 비슷한 sequence homology와 유사한 기능과 구조를 가지고 있다(Fig. 1). 이 중, 3차원적인 구조가 알려졌으며 임상에서 널리 이용되고

Sun Ju Chung, MD, PhD

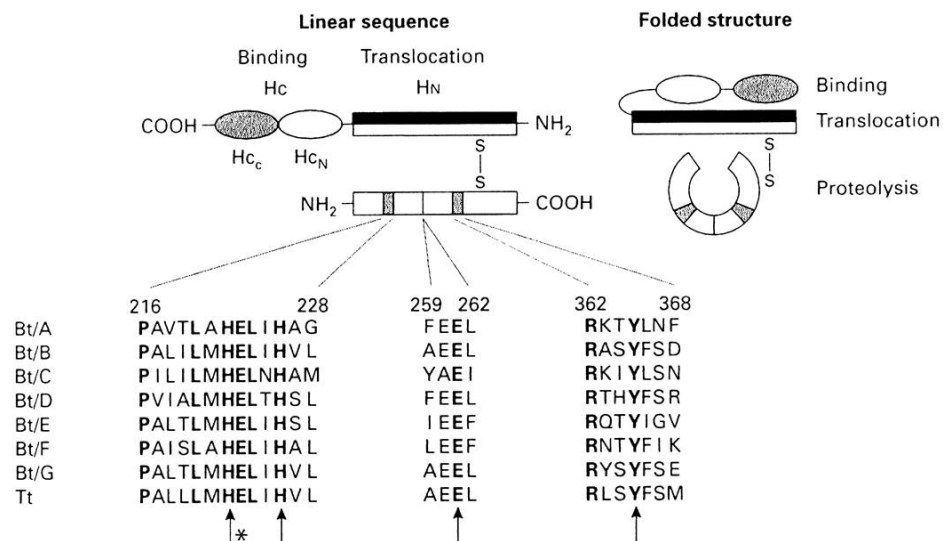
Department of Neurology, Asan Medical Center, University of Ulsan  
College of Medicine, 88 Olympic-ro 43-gil, Songpa-gu, Seoul 05505, Korea  
Tel: +82-2-3010-3988 Fax: +82-2-474-4691  
E-mail: sjchung@amc.seoul.kr

있는 BoNT-A와 BoNT-B도 약간의 차이를 제외하고 매우 비슷한 구조를 가지고 있다.<sup>6,7</sup> BoNT은 N-terminus light chain (L-chain)과 C-terminus heavy chain (H-chain)의 두 개의 chain으로 구성되어 있다(Fig. 1). 또한, 모든 BoNT은 binding, translocation, catalytic 등의 3개의 기능적 영역(functional domains)으로 구성되어 있다(Fig. 1).

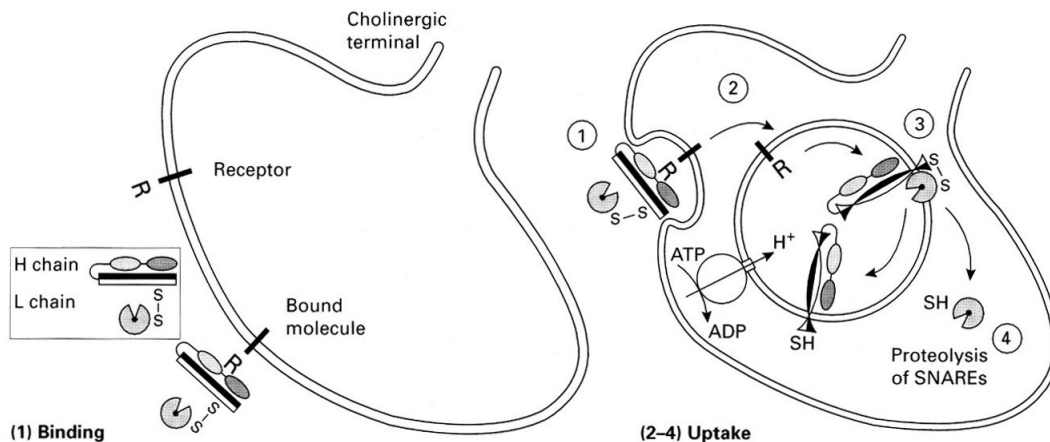
BoNT는 강력한 독소작용을 나타내는데, 단백질 1 mg 당  $2 \times 10^7$ 에서  $2 \times 10^8$  mouse median lethal doses의 독성을 보인다. BoNT는 신경전달물질인 아세틸콜린(acetylcholine)의 분비를 신경근접합부(neuromuscular junction)에서 시냅스전 기

전으로 억제시켜 그 기능을 발휘한다. 즉, 다음과 같은 4단계의 과정을 거친다(Fig. 2).<sup>8-10</sup>

A. binding: BoNT는 소장(intestine), 상처 부위, 주사 치료된 부위 등의 생산되었거나 흡수되는 곳에서 체액을 통해 말초 아세틸콜린성 신경말단부의 시냅스전 신경막 부위로 확산되어 아세틸콜린성 신경말단부에 특이하게 결합한다. 이 결합은 BoNT의 H-chain에 의해 이루어지는데, H-chain이 시냅스전 신경막에 존재하는 높은 친화력을 가지고 있는 수용물질(acceptor molecules)과 특이하고 비가역적인 결합을 한다. 이런 결합을 가능하게 하는 H-chain의 부위는



**Figure 1.** The three-functional domain structure of clostridial (botulinum) neurotoxins (BoNT). The neurotoxins are composed of two polypeptide chains, the heavy-chain (H-chain) (100 kDa), and light-chain (L-chain) (50 kDa) held together by a single disulphide bridge (S-S). The H-chain binds the toxin specifically to cholinergic neurons. The L-chain is a zinc-endopeptidase responsible for the toxic intracellular activity of BoNT. Arrows (↑) indicate amino acids involved in the coordination of zinc or in the hydrolysis of the target protein (e.g. SNAP-25).



**Figure 2.** Entry of BoNT inside nerve terminals. (1) BoNT binds to the presynaptic membrane at as yet unidentified receptors of peripheral cholinergic nerve terminals. (2) Binding is followed by internalization inside endocytic vesicles. (3) BoNT separates from the acceptor molecule. (4) Inside cytosol the L-chain catalyzes the proteolysis of one of three SNARE proteins.

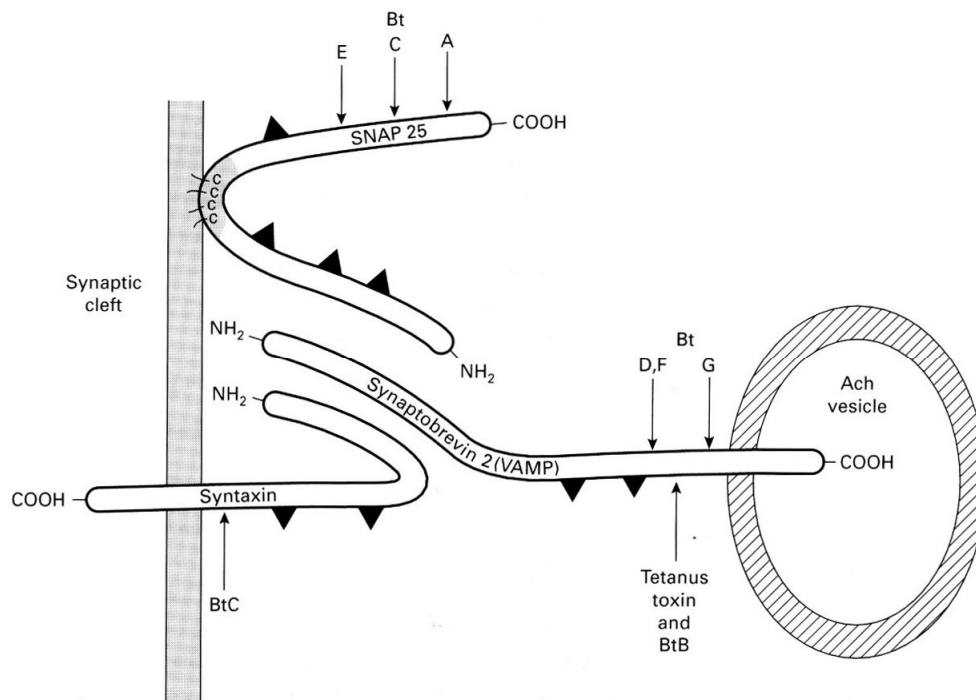
- H-chain의 carboxyl terminal에 가까운 반쪽 부위로 Hc로 불리는 활성 수용체 결합 영역이다(Fig. 2).<sup>11</sup>
- B. uptake: 수용체와 결합된 BoNT이 신경세포 안의 소포 안으로 들어가는 과정이다. BoNT은 수용체와 결합체를 이루어 막을 형성한endosomes으로 변형된 후 cytosol안으로 들어간다.
- C. Translocation: BoNT이 소포 막을 거쳐 cytosol안으로 분비된다. 소포 막의 proton pump가 소포 내를 산성화 시키고 BoNT의 모양을 변형시킨 후 일어난다.
- D. toxin activity: proteolysis 과정을 통해 아세틸콜린 분비 기능을 억제한다. 이와 같은 BoNT의 독성작용은 L-chain에 의해 일어난다. BoNT의 L-chain에 의한 독성작용은 아세틸콜린성 신경세포에 특이적이지 않다. 즉, BoNT이 아세틸콜린성 신경세포에 특이적인 것은 H-chain이 아세틸콜린성 신경세포에 특이적으로 결합하기 때문이며, L-chain의 proteolysis 기능은 비특이적이다. 따라서, L-chain을 glutamatergic 신경세포에 주사하면 glutamate의 분비도 억제한다.
- 아세틸콜린성 신경세포에서 아세틸콜린을 함유한 소포가 신경 세포 막과 융합한 후 아세틸콜린이 시냅스로 분비되기 위해서는 신경세포 말단부의 몇 가지 단백질들의 상호작용이 필요하다. 이런 단백질 중, vesicle-associated membrane protein (VAMP or synaptobrevin-2), synaptosomal associated protein

of MW 25 kDa (SNAP-25), syntaxin 등은 서로 유기적으로 연결되어 SNARE (SNap [soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment protein] receptor) complex를 형성하여 소포를 신경세포 막에 전달한 후 융합시켜 소포내의 아세틸콜린을 분비시킨다(Fig. 3).<sup>12,13</sup> BoNT의 L-chain은 BoNT의 serotype에 따라 세 가지 단백질을 인식하고 분해하는 매우 특이적인 protease이다.<sup>9,14</sup> BoNT-B, BoNT-D, BoNT-G 등은 각각 다른 부위의 VAMP를 절단한다(Table 1, Fig. 3).<sup>9,15</sup> BoNT-A와 BoNT-E는 SNAP-25를 절단하며, BoNT-C는 syntaxin과 SNAP-25를 동시에 전달한다(Table 1, Fig. 3).<sup>16-18</sup>

BoNT의 작용기간은 BoNT의 종류와 신경세포의 종류에 따라 다양하다. 인간의 신경근접합부에서 위에 설명한 BoNT의 작용의 기간은 약 2-4개월 정도이며, 자율신경에서는 이보다 길어 1년 이상이다.<sup>19</sup> BoNT 작용기간이 이처럼 다양한 이유는 정확히 밝혀지지 않았지만, cytosol내에서 L-chain의 수명, 잘려진 SNARE 단백질의 교환, 잘려진 SNARE 단백질로 인한 이차적인 생화학적 현상들로 인해 차이가 나는 것으로 예측된다.

### 3. BoNT-A and B

현재 임상에서 사용하고 있는 BoNT는 A형과 B형이고, 이 중 BoNT-A형이 거의 대부분의 임상에서 사용되고 있다. BoNT-A의 1 unit은 주어진 몸무게를 가진 쥐의 50%를 치사시킬 수 있는 용량을 뜻한다. BoNT-A로 임상에서 전 세계적으로 주로 사



**Figure 3.** Toxic action of botulinum neurotoxins (BoNT) by proteolysis of SNARE proteins, showing cleavage sites for BoNT and tetanus toxin.

용되고 있는 약물은 BOTOX<sup>®</sup> (Allergan, Irvine, CA)와 Dysport<sup>®</sup> (Ipsen Ltd., Slough, Berkshire, UK)이다. BoNT-B는 NeuroBloc (Elan, Shannon, Ireland)가 사용되고 있다. BoNT-A인 BOTOX<sup>®</sup>와 Dysport<sup>®</sup>는 용량에 따른 다른 효과와 효능을 나타내며, BoNT-B인 NeuroBloc<sup>®</sup>은 또 다른 효과와 효능을 보인다. 이를 정리한 것이 Table 2이다.

#### 4. BoNT의 면역학적 특성

BoNT은 매우 큰 단백질이기 때문에 다른 clostridial toxin인 tetanus toxin과 같이 면역학적 반응을 일으킬 수 있다. 하지만, BoNT의 면역학적 특성은 tetanus toxin의 면역학적 정보보다는 적게 알려져 있다. 아직 연구가 진행 중이지만, BoNT-A

인 BOTOX<sup>®</sup>의 경우 항체형성으로 인한 치료 실패는 전체 치료 받은 환자의 1% 이내인 것으로 보고되고 있다.<sup>20</sup> 다만, BoNT 치료에서 항체의 형성의 가능성을 낮추기 위해서는 사용되는 BoNT의 초기용량과 유지용량을 최소로 하고, 추가접종(booster injection)을 삼가하며, 최소 3개월 정도의 간격을 두고 주사치료를 해야 한다.

#### 5. BoNT의 장단점

BoNT의 장단점은 Table 3에 정리하였다.

#### 6. BoNT의 향후 발전 방향

BoNT가 많은 신경과 질환에서 효과적으로 사용되고 있으나,

**Table 1.** Target SNARE proteins of different botulinum toxins serotypes

Toxin serotype	SNARE target	Cleavage site	Target localization*
A	SNAP-25	Gln197-Arg198	Presynaptic plasma membrane
B	VAMP/synaptobrevin	Gln76-Phe77	Synaptic vesicle
C	Syntaxin 1A Syntaxin 1B	Lys253-Ala254 Lys252-Ala253	Presynaptic plasma membrane
D	VAMP/synaptobrevin Cellulobrevin	Lys59-Leu60 Unknown	Synaptic vesicle All cells: vesicles of endocytosing/recycling system
E	SNAP-25	Arg108-Ile181	Presynaptic plasma membrane
F	VAMP/synaptobrevin Cellulobrevin	Gln58-Lys59 Unknown	Synaptic vesicle All cells: vesicles of endocytosing/recycling system
G	VAMP/synaptobrevin	Ala81-Ala82	Synaptic vesicle

\*Within neurone unless stated otherwise.

SNAP-25, synaptosomal associated protein of MW 25KDa; SNARE, soluble N-ethyl-maleimide Sensitive factor attachment protein receptor; VAMP, vesicle-associated membrane protein

**Table 2.** Comparison between available preparations of botulinum toxin

Preparation	Botox <sup>®</sup>	Dysport <sup>®</sup>	Neurobloc <sup>®</sup> /MYOBLOC <sup>™</sup>
Serotype	A	A	B
Manufacturer	Allergan Ltd (US)	Ipsen (UK) (formerly Porton And then Speywood)	Elan-Athena (US)
Relative potency per mu*	3-5	1	0.01-0.02
Equivalent dose (mu)*	1	3-4	50-100
Contents of one vial (mu)	100 mu	500 mu	2500:5000:10,000 mu
1 ng toxin-haemagglutinin	20 mu	40 mu	100 (70-130) mu
Protein load/dose	5 ng in 100 mu	12.5 ng in 500 mu	100 ng in 10,000 mu
Presentation	Powder Reconstitute with 0.9% saline	Powder Reconstitute with 0.9% saline	Liquid 5,000 mu/mL Can be diluted with 0.9% saline
Shelf life unopened (from the date of Manufacture)	24 months	12 months	21 months
Stored at	2-8°C	2-8°C	2-8°C or room Temperature
Shelf life Opened/reconstituted, If aseptic technique	4 h	8 h	4 h
Refrigerate at	2-8°C	2-8°C	2-8°C or room Temperature

**Table 3.** Advantages and disadvantages of botulinum toxin

Advantages	Disadvantages
Often simple, given in outpatients, focused	Can be complex, requiring experience
Side-effects few and short-lived	Wears off, has to be repeated
Flexible-can 'chase' involuntary activity	Potentially expensive, funds not identified
Reduces need for systemic drugs	Logistical-organizing a clinic
Easily integrated with other treatment	Long-term commitment
Benefits independent of cause of abnormality	Inadequate for widespread disease
	Discomfort of multiple injections

몇 가지 해결해야 할 문제가 상존하고 있다. 약효가 대부분의 질환에서 2-4개월 지속되고 길게는 6개월까지 지속되기도 하는데, 많은 환자들이 좀 더 긴 지속효과를 원하기 때문에 BoNT의 치료효과가 연장될 수 있도록 연구가 진행되고 있다. 특히, hybrids나 conjugateds 형태로 BoNT를 생성하는 연구가 기대된다. 같은 환자라 할지라도 BoNT를 시술하는 의사의 기술에 따라 치료효과가 다양하게 나타날 수 있기 때문에, BoNT치료를 필요로 하는 근육에 정확하게 BoNT를 주사할 수 있는 보조적인 진단도구와 주사방법이 개발되어야 할 것이다. 또한, 국내의 환자들에게 BoNT는 고가로 느껴지기 때문에, 약가에 대한 고려가 추가적으로 있어야 할 것이다.

## 결론

BoNT는 치료적 효과가 매우 강력하며 치료 대상 환자를 잘 선택하고 숙련된 기술로 주사치료를 한다면 신경과 질환에 대한 우수한 치료효과를 보이는 치료제이다. BoNT에 대한 기초적 지식을 잘 이해하고 권장되는 치료법에 따라 환자에게 적용한다면 많은 신경과 질환에서 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

## REFERENCES

- Steinbuch JG. Vergiftung durch verdorbene Würste. *Tübinger Blätter für Naturwissenschaften und Arzneykunde* 1817;3:26-52.
- Kerner J. Neue Beobachtungen über die in Württemberg so häufig vorkommenden tödlichen Vergiftungen durch den Genuss geräucherter Würste. Tübingen: Oslander, 1820.
- Devriese PP. On the discovery of *Clostridium botulinum*. *J Hist Neurosci* 1999;8:43-50.
- van Ermengem E. Classics in infectious diseases. A new anaerobic bacillus and its relation to botulism. E. van Ermengem. Originally published as "Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus" in *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 26: 1-56, 1897. *Rev Infect Dis* 1979;1:701-719.
- Sathyamoorthy V, DasGupta BR. Separation, purification, partial characterization and comparison of the heavy and light chains of botulinum neurotoxin types A, B, and E. *J Biol Chem* 1985;260:10461-10466.
- Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR, Stevens RC. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol* 1998;5:898-902.
- Swaminathan S, Eswaramoorthy S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat Struct Biol* 2000;7:693-699.
- Simpson LL. The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. *Pharmacol Rev* 1981;33:155-188.
- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* 2000;80:717-766.
- Montecucco C, Papini E, Schiavo G. Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Lett* 1994;346:92-98.
- Kozaki S, Ogasawara J, Shimote Y, Kamata Y, Sakaguchi G. Antigenic structure of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin and its interaction with gangliosides, cerebroside, and free fatty acids. *Infect Immun* 1987;55:3051-3056.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 1998;395:347-353.
- Chen YA, Scales SJ, Patel SM, Doung YC, Scheller RH. SNARE complex formation is triggered by  $Ca^{2+}$  and drives membrane fusion. *Cell* 1999;97:165-174.
- Rossetto O, Seveso M, Caccin P, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. *Toxicon* 2001;39:27-41.
- Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 1992;359:832-835.
- Blasi J, Chapman ER, Yamasaki S, Binz T, Niemann H, Jahn R. Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *Embo J* 1993;12:4821-4828.
- Blasi J, Chapman ER, Link E, et al. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 1993;365:160-163.
- Schiavo G, Santucci A, Dasgupta BR, et al. Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS Lett* 1993;335:99-103.
- Naumann M, Jost WH, Toyka KV. Botulinum toxin in the treatment of neurological disorders of the autonomic nervous system. *Arch Neurol* 1999;56:914-916.
- Dressler D, Hallett M. Immunological aspects of Botox, Dysport and Myobloc/NeuroBloc. *Eur J Neurol* 2006;13 Suppl 1:11-15.